

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-500580

(43) 公表日 平成7年(1995)1月19日

第3部門第2区分

(51)Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I	
A 6 1 K 38/00	ADP	8314-4C	A 6 1 K 37/ 02	ADP
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 11 頁)				
(21)出願番号	特願平5-504766			
(86) (22)出願日	平成4年(1992)9月9日			
(85)翻訳文提出日	平成6年(1994)3月9日			
(86)国際出願番号	PCT/AU92/00480			
(87)国際公開番号	WO93/04690			
(87)国際公開日	平成5年(1993)3月18日			
(31)優先権主張番号	PK8279			
(32)優先日	1991年9月9日			
(33)優先権主張国	オーストラリア (AU)			
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, SE), AU, CA, JP, US			
(71)出願人	ペプチド テクノロジー リミテッド オーストラリア国 2099 ニュー サウス ウェールズ ディー ホワイ インマン ロード 4-10			
(71)出願人	キングス カレッジ ロンドン イギリス国 WC2R 2LS ロンドン ザ ストランド (番地なし)			
(72)発明者	ミカエリス, ジューゲン オーストラリア国 2118 ニュー サウス ウェールズ カーリングフォード ホニ トン アヴェニュー イースト 10			
(74)代理人	弁理士 志賀 正武 (外2名)			
最終頁に続く				

(54) 【発明の名称】 糖尿病の合併症及び病因の処理方法

## (57) 【要約】

本発明は糖尿病の合併症と病因との治療のための方法を提供する。この方法は ( $\beta$ -Ala-His)<sub>n</sub>、(Lys-His)<sub>n</sub>、式  $R_1-x-R_2$  の化合物、製薬上許容し得るそれらの塩類とそれらの組み合わせ；及び製薬上許容し得る媒体、ここで  $n$  は 2-5 であり、 $R_1$  は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファアミノが 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってアセチル化され、 $R_2$  は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファカルボキシルが 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってエステル化又はアミド化され、及び  $X$  は  $R_1-L$  又は  $D-His(R_1)-R_2$  であり、ここで  $R_1$  は空位か又は 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子の  $\omega$ -アミノアシルであり、 $R_2$  は空位又はアルキル-スルフィド、ヒドロキシル、ハロゲン及び/又はアミノ基による修飾イミダゾールであり、 $R_3$  は空位又は 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のカルボキシ (アルキル) アミドである、よりなる群から選択された化合物

を備えた組成物の糖尿病患者への投与を包含する。好ましくはその化合物はカルノシンである。

## 請求の範囲

1 (β-Ala-His)n (Lys-His)n、式R<sub>1</sub>-x-R<sub>2</sub>の化合物、製法上許容し得るそれらの塩類とそれらの組み合わせ；及び製法上許容し得る塩、ここでnは2-5であり、R<sub>1</sub>は1又は2の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファ-アミノが1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってアセチル化され、R<sub>2</sub>は1又は2の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファ-カルボキシルが1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってエステル化又はアミド化され、及びXはR<sub>3</sub>-L又はD-His (R<sub>4</sub>)-R<sub>5</sub>であり、ここでR<sub>3</sub>は空位か又は1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のω-アミノアシドであり、R<sub>4</sub>は空位又はアルキル-スルフィド、ヒドロキシル、ハロゲン及び/又はアミノ基による修飾イミダゾールであり、R<sub>5</sub>は空位又は1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のカルボキシ(アルキル)アミドである、よりなる群から選択された化合物を調える製造物を製薬に投与することを備えた腫瘍疾患における合併症と腫瘍の病状の治療方法。

2 前記化合物がカルノシン、アンセリン、オフィジン、ホモカルノシン、ホモアンセリン、D-カルノシンとカルシニンからなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第1項記載の方法。

3 前記化合物がカルノシンであることを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

4 R<sub>1</sub>とR<sub>2</sub>がL-又はD-リジン又はL-又はD-アスパラギン酸又はL-又はD-グルタミン酸又はそれらの相同物であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の方法。

5 前記化合物がさらにアミノグアニジンを含めることを特徴とする請求の範囲第1項から第4項のうちいずれか1項記載の方法。

6 前記化合物がインシュリンホルモンの炭水化物、ピグアニジン及び/又はアミリン阻害体とともに共投与されることを特徴とする請求の範囲第1項から第5項のうちいずれか1項記載の方法。

7 前記化合物が注射、注入、摂取、吸入、点滴、イオン導入法又は局所付加

13 前記化合物がカルノシン、アンセリン、オフィジン、ホモカルノシン、ホモアンセリン、D-カルノシンとカルシニンからなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第12項記載の使用。

14 前記化合物がカルノシンであることを特徴とする請求の範囲第13項記載の使用。

15 R<sub>1</sub>とR<sub>2</sub>がL-又はD-リジン又はL-又はD-アスパラギン酸又はL-又はD-グルタミン酸又はそれらの相同物であることを特徴とする請求の範囲第12項記載の使用。

16 前記薬がさらにアミノグアニジンを含めることを特徴とする請求の範囲第12項から第15項のうちいずれか1項記載の使用。

17 前記薬がインシュリンホルモンの炭水化物、ピグアニジン及び/又はアミリン阻害体とともに共投与されることを特徴とする請求の範囲第12項から第16項のうちいずれか1項記載の使用。

18 前記薬が注射、注入、摂取、吸入、点滴、イオン導入法又は局所付加によって投与されることを特徴とする請求の範囲第12項から第17項のうちいずれか1項記載の使用。

19 前記薬が経口的又は点眼的に投与されることを特徴とする請求の範囲第12項から第18項のうちいずれか1項記載の使用。

20 前記化合物が、その組成物が皮膚穿通、皮膚付着、組織吸収/吸着、皮膚透皮及び/又は皮膚病変に際しては改善されたような分子であるところの別な分子と混合され又は結合されたものである請求の範囲第12項から第19項のうちいずれか1項記載の使用。

21 前記分子が、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアンモニウムオキシド、オゾン、デシルメチルスルホキシド、ラウリルエトキシレート、オクテノール、ジメチルスルホキシド、プロピレングリコール、ニトログリセリン、エタノール及びそれらの組み合わせよりなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第20項記載の使用。

22 前記化合物が薬剤製剤の形態中にあることを特徴とする請求の範囲第12項から第21項のうちいずれか1項記載の使用。

によって投与されることを特徴とする請求の範囲第1項から第6項のうちいずれか1項記載の方法。

8 前記組成物が経口的又は点眼的に投与されることを特徴とする請求の範囲第1項から第7項のうちいずれか1項記載の方法。

9 前記組成物が、その組成物が皮膚穿通、皮膚付着、組織吸収/吸着、皮膚透皮及び/又は皮膚病変に際しては改善されたような分子であるところの別な分子と混合され又は結合されたものである請求の範囲第1項から第7項のうちいずれか1項記載の方法。

10 前記分子が、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアンモニウムオキシド、オゾン、デシルメチルスルホキシド、ラウリルエトキシレート、オクテノール、ジメチルスルホキシド、プロピレングリコール、ニトログリセリン、エタノール及びそれらの組み合わせよりなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第9項記載の方法。

11 前記化合物が薬剤製剤の形態中にあることを特徴とする請求の範囲第1項から第10項のうちいずれか1項記載の方法。

12 腫瘍の合併症と病状の治療のための薬の調製において、(β-Ala-His)n (Lys-His)n、式R<sub>1</sub>-x-R<sub>2</sub>の化合物、製法上許容し得るそれらの塩類とそれらの組み合わせ；及び製法上許容し得る塩、ここでnは2-5であり、R<sub>1</sub>は1又は2の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファ-アミノが1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってアセチル化され、R<sub>2</sub>は1又は2の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファ-カルボキシルが1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってエステル化又はアミド化され、及びXはR<sub>3</sub>-L又はD-His (R<sub>4</sub>)-R<sub>5</sub>であり、ここでR<sub>3</sub>は空位か又は1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のω-アミノアシドであり、R<sub>4</sub>は空位又はアルキル-スルフィド、ヒドロキシル、ハロゲン及び/又はアミノ基による修飾イミダゾールであり、R<sub>5</sub>は空位又は1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のカルボキシ(アルキル)アミドである、よりなる群から選択された化合物の使用。

## 明 細 書

## 腫瘍の合併症及び病状の治療方法

本発明は、腫瘍の合併症と病状の治療方法に関する。

ジベプチドであるカルノシンは、両から得られる無安定性抽出物質として、約90年前に発見された(Golevitch & Alradzibi, 1990)。以来これら初期の抽出物については、ジベプチドの分布と代謝に関する多くのデータが蓄積された。カルノシン(β-アラニル-L-ヒスチジン)、及びアンセリン(β-アラニル-L-メチル-L-ヒスチジン)やホモカルノシン(γ-アミノ-ブチル-L-ヒスチジン)のような、その関連化合物は、多数の哺乳動物の神経筋(2-30mM)や脳(0.3-5mM)を含む組織に、ミリモル濃度で存在している。ジベプチドのこの群の、生理学的機能を説明するための統一された仮説は存在していないが、それらの抗酸化特性、放射線障害からのDNAの保護能力、二価カチオンのキレート能、生理的pH値での顕著な緩衝能力から、それらのインビボでの主要な機能が、タンパク質、脂質及び他の巨大分子を保護するものであるとの提案がなされた。

自由ラジカル捕獲剤としての機能に付け加えて、カルノシンは「免疫調節剤」として作用し(ナガイ(Nagai)特許、GB 2143732A)、それは、ある種の癌治療に有効な性質を持つことが主張されている(ナガイ、特許 DE 3424781A1)。カルノシンは、過酸化脂質に誘起された脂質の酸化にも有効であることが示された(Savishayev, 1989)。また、カルノシンは、外傷の治癒過程を促進できるという証拠もある。

## 非酵素的グリコシレーション(glycosylation)

自由ラジカル阻害は、タンパク質及び核酸の両方に作用する唯一の過程ではない。非酵素的グリコシレーション(グリケーション(glycation))である。食物化学におけるメイラード反応(Meylrad, 1912)または褐色反応は、アミノ基と糖アルデヒドまたはケト基との反応を含み、それは炭性アミノ基を生成し、結局グリコシレーションが進行した最終生成物(advanced-glycosylation-end-pr

oducts) (AGEと生成物)を形成する。インビボでのグリケーションは遅いが、基本的に重要なのは、老いること、及び血糖レベルが上昇する、即ち糖尿病という病理学的状況である。

タンパク質のグリケーションは臓器の中で実施することができる。いくつかの研究により、ほとんどのタンパク質とDNAが、非酵素的グリコシレーションの潜在的ターゲットであり、そこでは、糖分子のアミノ基に、シッフ塩基を形成して結合し始めるといことが示された。引続き再配列が起こり、着色された生成物を与える(アマドリ生成物と呼ばれる)。さらに、アマドリ生成物の速く特異化されていない反応が起こる。

タンパク質中の好ましいグリケーション部位の分析により、リジン残基のεアミノ基が、特にヒステリン残基に近接しているとき、主要な目標になることが示された(ShiltonとVollon, 1991)。インビボでの長い半減期を持つ安定なペプチドの合成において、カルノシンのアミノ酸配列がレソナー-H<sub>2</sub>Oに類似しており、糖と反応し、アルデヒド配列として反応する能力を有していることを見いだした。さらに、カルノシンは実験的に非毒性であり、よく証明された毒性試験によれば、その飼料は哺乳類に5~10g/体重kgのレベルまで投与することができ、長期間の治療にわたって毒性副作用は予想されないことを示した。

その他のたまた一つの化合物だけが、糖と反応し、アマドリ再配列を減速することにより、グリケーションを遅延化することが示された。アミノグアニジン、インビボとインビトロの両方で、グルコースなどのグリケーションが進行した最終生成物を減少させる。不幸にも求得的なヒドラジンであるアミノグアニジンは、非生理的であり、知られていない長期の毒性がある。

#### 糖尿病

糖尿病は、インシュリンの急性または慢性欠乏に起因する代謝上の疾患である。これは、血液グルコースレベルの上昇によって診断される。急性状態は、インシュリン依存性糖尿病のグルコース取り込みの減少によって特徴づけられる。生体はその結果生ずる脂肪分解の増加とグリコーゲン合成の減少によるエネルギー不足を中和する。糖尿病の病状が重篤であるとき、糖尿病は2つの主要な源から失われ

な効果を有していると思われる。

#### グリケーションとアテローム性動脈硬化症

最近の研究により、Aβとアテローム性動脈硬化症の進行において機能的な類似性があるかもしれないことが示唆されている。これは、ヒトの単球が、その原因にAGE特異性レセプターを有しており、リリーシング(releasing)シグナルによって刺激されたとき応答するという発見に基づいている。血管壁に対する小さな障害は、サブ-内皮AGEに類似し、単球の浸潤を促進し、アテローム性動脈硬化症の進行を開始する。循環しているリポタンパクもまたグリケーションを受け、それは、グリケーションされたリポタンパクより早い速度で内皮細胞によって取り込まれる。これは、糖尿病において重要であり、グリケーションされたリポタンパクの血中レベルの上昇が報告されている。従って、カルノシンのような抗グリケーション特性を有する化合物は、血管の疾患に薬理的な効果を持つ。

糖尿病合併症の理由は十分に理解されていないので、薬理的な過血糖状態を避けるために必要なグルコース濃度の変化に反応して、皮下注射後にインシュリンを連続的に放出することは、適当ではないかもしれない。従って、糖尿病の血糖レベルは、平均して健康人より高く、それはグリケーションのレベルの増加をもたらす。最もよい例は、グリコヘモグロビンであり、それは総グルコースレベルに比例した量が赤血球中で非酵素的に形成する。グリケーションされたヘモグロビンと血清アルブミンの割合が高いことは、糖尿病の過血糖の重症の指標に使用される。

血中の高いグルコースレベルの長期にわたる影響を中和する化合物の、新調された食料の摂取、アミン系薬での、インシュリン投与、スルホニル尿素とビグアニド(biguanide)処理のような制御された糖尿病治療に付加することは有効であろう。グリケーションに参加するのは、グルコース、ガラクトース、フルクトース、リボース及びデオキシリボースのような還元糖の開環型だけである。この自由アルデヒド基を保護し、それを非毒性形態に結合させることにより、インビボ及びインビトロでの高い血糖レベルに起因する障害を減少できるものと信じている。合併症と病理の処理のために提案された化合物は、以下の特徴のうち

る。即ち、グルコースは炭水化物であり、体タンパク質もまた炭水化物である。これは、インシュリンが促進する腸胃から吸収されるアミノ酸からの糖新生が不十分だからである。急性の糖尿病は、インシュリン注射によって制御できるが、その制御は決して完璧にはできないので、糖尿病の長期にわたる運命は、生涯の後期に、目(白内障や網膜症)、腎臓(腎臓病)、神経(神経症)、及び血管(血管性アテローム性動脈硬化症(atherosclerosis))において起こる合併症に依存する。冠状心疾患は、糖尿病及び非糖尿病も同様に、最も一般的な死因であることは充分認識されている。

低タンパクの分析は、糖尿病患者の重大な腎臓疾患(腎臓病)の存在を排除するために通常要求される。低タンパク結果が正であることは、一過性または重要でない検査の発見であるかもしれないし、あるいは腎臓障害の初期徴候であるかもしれない。最も重大な合併症は、腎臓病、ハイパーテンション、及び進行している腎臓障害に関連している。これらの条件下では、腎臓球は、タンパク質の透過性が上昇するが、その機構はあまり解明されていない。その影響は、全身障害をむしろ加速に促進させ、最終的に死に至らしめるので非常に重大である。このタンパク尿の生成は、糖尿病、高脂血症、高血圧、高尿酸血症などの二次的併発として起こる。

糖尿病の他の合併症として、網膜疾患の進行におけるグリケーションの潜在的役割を考慮に入れなければならない。網膜毛細血管は、毛細血管内腔に並び、濾過性(血液-網膜)障壁を形成する内皮細胞及び周皮細胞(endothelial cells)を含んでおり、それらは、その2つの細胞タイプにより生成される基底膜で包まれている。糖尿病性網膜疾患の初期段階において、基底膜障壁は選択的に失われ、基底膜を取り囲んだゴーストのような膜を放出する。血液-網膜障壁の破壊は、もうひとつの故障である。アルドース還元酵素阻害剤が、動物の実験的網膜疾患の治療において研究されている。それらの作用の機構は、ソルビトールの蓄積と、結果としての浸透性の変化を阻害することである。しかし、ハメス(Hamess et al.) (1991)が、アミノグアニジンが実験的糖尿病性網膜疾患の進行を阻害することを示したという事実から、非酵素的グリコシレーションとの結合が明らかになった。カルノシンのような他の潜在的なグリケーション阻害剤も候補的

のひとつまたはそれ以上を有するペプチドである。

- 1) 比較的高い投与量においても非毒性であること。
- 2) 腸内の非酵素的プロテアーゼによって分解されず、完全に血液または器官に吸収されること。しかし、腎臓によってクリアされ、それによって糖尿病のグルコースとして類似の組織に分布させること。
- 3) そのペプチドは、タンパク質中のアミノ基に比較して、還元糖と強く反応すること。
- 4) 最終的にグリケーションしたペプチドは、グリケーションしたアミノ酸とは逆に、突然変異原性とならないこと。
- 5) そのペプチドが血液または組織中の特異的プロテアーゼにより分解したならば、結果的なアミノ酸は、糖尿病の重要な徴候がある、例えば糖新生を促進したり其の達成平衡を中和したりすること。

#### 発明の要約

本発明者らは、カルノシンと類似の特性を持つペプチドは、糖尿病の合併症及び原因の処理に有効であると認める。

従って、第1の形態において、本発明は、糖尿病の合併症及び原因の処理方法である。その処理方法では、糖尿病患者へ(β-Ala-His)<sub>n</sub>、(Lys-His)<sub>n</sub>、一般式R<sub>1</sub>-X-R<sub>2</sub>の化合物、それらの変異体、それらの変異体と結合するアミノ酸、及びそれらの組合せからなる群から選ばれた化合物と、変異体と結合するアミノ酸からなる組成物を投与する。ここで、nは2-5、R<sub>1</sub>は1または2の天然発生(natural occurring)アミノ酸で、炭水化物1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアラルキルでエステル化されたα-カルボキシルを有していてもよい。R<sub>2</sub>は1または2の天然発生アミノ酸で、炭水化物1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアラルキルでアセチル化されたα-アミノを有していてもよい。また、XはR<sub>3</sub>-LまたはD-His(R<sub>4</sub>)-R<sub>5</sub>であって、R<sub>3</sub>は空位または炭水化物1から12、好ましくは2から6のω-アミノアルキルである。R<sub>4</sub>は空位またはアルキル-スルフィド、ヒドロキシル、ハロゲン及び/またはアミノ基で修飾されたイミダノールであり、R<sub>5</sub>は空位または炭水化物1から1

2. 好ましくは2から6のカルボキシル(アルキル)アミドである。

第2の態様において、本発明は、 $(\beta\text{-Ala-His})_n$ 、 $(\text{Lys-His})_n$ 、一般式 $R_1\text{-X-R}_2$ の化合物、それらの変異上許容される塩、及びそれらの組合せからなる群から選ばれた化合物の、糖尿病の合併症及び病態の処理用医薬品の合成における用途である。ここで、 $n$ は2-5、 $R_1$ は1または2の天然発生アミノ酸、変異数1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアラルキルでエステル化された $\alpha$ -カルボキシルを有していてもよい。 $R_2$ は1または2の天然発生アミノ酸、変異数1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアラルキルでアセチル化された $\alpha$ -アミノを有していてもよい。また、 $X$ は $R_3\text{-}$ または $\text{D-His (R}_4\text{)}\text{-R}_5$ であって、 $R_3$ は空位または変異数1から12、好ましくは2から6の $\omega$ -アミノアルキルである。 $R_4$ は空位またはアラルキル-スルフィド、ヒドロキシル、ハロゲン及び/またはアミノ基で修飾されたイミダゾールであり、 $R_5$ はボイドまたは変異数1から12、好ましくは2から6のカルボキシル(アルキル)アミドである。

本発明の好ましい実施態様では、 $R_1$ 及び $R_2$ は、 $\text{L-}$ または $\text{D-}$ リジンあるいは $\text{L-}$ または $\text{D-}$ アスパラギン酸あるいは $\text{L-}$ または $\text{D-}$ グルタミン酸あるいはそれらの相同体である。本発明の好ましい実施態様では、その化合物はカルノシン、アンセリン、オフィジン、ホモカルノシン、ホモアンセリン、 $\text{D-}$ カルノシン、及びカルシニンからなる群から選ばれ、最も好適には、化合物はカルノシンである。

本発明のさらに好ましい実施態様では、その組成物は、アミノグアニジンのような、糖尿病の合併症及び病態の処理に有利な効果をもたらす他の化合物を含む。さらに、多くの治療されるべき患者がインシュリンスルホン酸、ビグアニド、またはノミリン薬物治療を受けていてもよく、本発明の組成物は、そのインシュリンスルホン酸、ビグアニド、またはアミリン薬物治療と併投与してもよい。

スルホン酸ビグアニド治療についてのさらなる情報は、ベック・ニールセン(Beck-Nielsen)の"Pharmacology of Diabetes" C E Jørgensen と C Stan d l 編、1991、pp75-92、そこに含まれる参考文献の開示に見いだされる。

上で述べたように、その組成物は注射によって投与してもよい。例えば、無菌の注射可能な水性もしくは油性懸濁液のような注射可能な製剤は、適宜の分散または溶解剤及び懸濁剤を使用して、当業者によく知られた方法に従って製造できる。その無菌の注射可能な製剤は、非毒性で非刺激性に許容される希釈剤またはお風呂中の、無菌注射可能な塩または懸濁液でもよい。採用してよい塩及び溶媒は、水、リンゲル液、及び生理食塩水である。さらに、無菌の固定剤(fixed oil)は、油または懸濁液として、従来通り採用することができる。この目的のために、合成モノ-ジグリセリドを含む任意の固やかな固定油を採用してよい。さらに、オレイン酸のような脂肪酸は、注射可能な製剤で使用できることがわかった。

その組成物の投与すべき日毎の全投与量は、治療されるべきホスト及び、特に投与方法に依存するだろう。ある特定の患者への特定の投与量レベルは、採用されたその特定の化合物の活性、年齢、体重、一般的健康、性、食料、投与時間、投与経路、投与速度、及び患者が受ける副作用の量を含む要因の質に依存することは理解できるであろう。必要とされる投与量レベルの選択は、この分野の熟達した者の専門的技術の範囲内であると見られる。

カルノシンの投与量は、20 mg から 2 g/体重 kg/日であり、好ましくは100 mg から 200 mg/体重 kg/日であろうと見られる。

上で述べたように、糖尿病に罹患した合併症のひとつは白内障である。従って本発明の組成物の投与の特に好ましい形態は、点眼である。この状況において、製薬上許容されるキャリアは、無菌の水性または非水性懸濁液、懸濁液、乳化液、及び散剤である。点眼に適した製薬上許容される塩の例は、プロピレングリコール及び、製薬上許容されるアルコール、ゴマまたはビーナツブ油及び他の製薬上許容される油、石油ゼリー、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース塩、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースのような水溶性の塩に許容される非毒性ポリマー、ポリアクリル酸塩、アクリル酸エステル、ポリアクリルアミドのようなアクリレート、ゼラチン、アルギネート、ペクチンのような天然物、酢酸デンプン、ヒドロキシエチルデンプンエーテル、ヒドロキシプロピルデンプンのようなデンプン誘導体、同様に、ポリビニルアルコール、ポ

リビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリエチレノキド、カルボポール(carbopol)及びキサンタンガムのような合成誘導体、そしてそれらのポリマーの混合物である。そのような組成物は、界面剤、保存剤、緩衝剤、乳化分散剤のような補剤を含んでもよい。好ましい保存剤は、四級アンモニウム化合物、フェニル水酸塩、ベンゾイルアルコール、フェニルエタノールなどの抗菌剤、及びメチルパラベンナトリウムのような酸化防止剤を含んでいる。好ましい緩衝剤は、ボレート、アセテート、グリコネート及びホスフェート緩衝剤を含んでいる。製薬的な点眼の組成物は、ソリッド・インサート(solid insert)の形態であってもよい。

これまでの議論で明らかのように、糖尿病の合併症及び病態は、非糖尿病のグリコシレーションを減少または防止することによって処理できる。従って、本発明の方法は、非糖尿病のグリコシレーションによる他の疾患状態の、他の有害な合併症及び病態の処理に有効であることが予想できる。

本発明の性質がより明確に理解されるために、好ましい形態を、以下の実施例及び図面を参照して説明する。

さらに好ましい具体例では、活性化合物は、組成物の皮膚浸透、皮膚散布、経口経皮吸収/吸収、皮膚局作、及び/または皮膚刺激を改善するような他の分子と混合または混合している。その分子は、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアンモニウムオキシド、オゾン、デシルメチルスルホキシド、ラウリルエトキシレート、エタノール及びそれらの混合物からなる群から選ばれたものが好ましい。

その化合物は、薬物前駆体(prodrug)の形態であってもよい。プロドラッグ技術のさらなる情報は、「医薬品デザインと発達のテキストブック(A Text Book of Drug Design and Development)」、ポプル・クログスガード・ラーセンとハンス・ブンドガード(Povl Krogsgaard-Larsen and Hans Bondgaard) 編、3巻「プロドラッグのデザインと応用(Design and Application of Prodrugs)」H. ブンドガードに見いだすことができる。この参考文献の開示は、ここでクロスリファレンス(cross-reference)として含まれている。

上で述べたように、本発明の組成物は経口投与されるのが好ましい。当業者には理解されるように、その組成物を経口デリバリー(delivery)への適合性を改善するよう多くの修飾をなすことができる。経口デリバリーのさらなる情報は、「ペプチドとタンパク質ドラッグデリバリー(Peptide and Protein Drug Delivery)」、ビンセント H. L. リー(Vincent H. L. Lee) 編、16巻「ペプチドとタンパク質ドラッグデリバリーの経口経路(Oral Route of Peptide and Protein Drug Delivery)」V. H. L. リーらに見いだすことができる。この参考文献の開示は、ここでクロスリファレンスとして含まれている。

リビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリエチレノキド、カルボポール(carbopol)及びキサンタンガムのような合成誘導体、そしてそれらのポリマーの混合物である。そのような組成物は、界面剤、保存剤、緩衝剤、乳化分散剤のような補剤を含んでもよい。好ましい保存剤は、四級アンモニウム化合物、フェニル水酸塩、ベンゾイルアルコール、フェニルエタノールなどの抗菌剤、及びメチルパラベンナトリウムのような酸化防止剤を含んでいる。好ましい緩衝剤は、ボレート、アセテート、グリコネート及びホスフェート緩衝剤を含んでいる。製薬的な点眼の組成物は、ソリッド・インサート(solid insert)の形態であってもよい。

これまでの議論で明らかのように、糖尿病の合併症及び病態は、非糖尿病のグリコシレーションを減少または防止することによって処理できる。従って、本発明の方法は、非糖尿病のグリコシレーションによる他の疾患状態の、他の有害な合併症及び病態の処理に有効であることが予想できる。

本発明の性質がより明確に理解されるために、好ましい形態を、以下の実施例及び図面を参照して説明する。

第1図は、 $\text{L-}$ カルノシンと糖との反応速度を示す。 $\text{L-}$ カルノシン(60 mM)は、pH 7の50 mM ナトリウムリン酸緩衝液中で、5時間60°Cで、糖(180 mM)と反応させ、カルノシンの目印アミノ基の減少を HPLC によって決定した。SEM (母液混合物中の全カルノシンの±1%)

第2図は、カルノシンのアテローム性動脈硬化化に対する影響を示す。(ニコレスチロール、ニコレスチロール+カルノシン)

第3図は、糖尿病ラットにおける白内障の形成に対するカルノシンの影響を示す。(糖尿病、図糖尿病、図糖尿病+カルノシン)。

#### 発明の追加の説明

##### 方法

##### 特に許容されるペプチドとアミノ酸誘導体との反応

別の方法を除き、反応は、60°Cの水浴中、密封されたマイクロ反応管を用いた。別の方法を除き、反応は、60°Cの水浴中、密封されたマイクロ反応管を用いた。別の方法を除き、反応は、60°Cの水浴中、密封されたマイクロ反応管を用いた。



(作還元糖)により置換される。グルコースまたはソルビトール(50 mMのリ  
ン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.0)の中、250 mg/ml)の500 μlは、  
18時間、50℃で、異なるアミノ酸またはカルノシン(500 mM)を用いて  
インキュベートされる。その結果生じる溶液の400 nmの光学濃度が測定され  
る(表2)。カルノシンは、最も早く反応するアミノ酸、L-リジン又はベータ  
-アラニンの各々よりも、約2倍、または、8倍以上に、より多くのメイラード  
反応生成物を形成する。少量のメイラード反応の生成物は、カルノシンがソルビ  
トールと反応したときに、多分還元糖へのソルビトールの自動酸化のために明白  
となる。

[以下空白]

## 表2表

グルコース又はソルビトールとジペプチド又はアミノ酸との間のメイラード反  
応生成物の400 nmでの吸光度

インキュベーション条件	OD 400 nm
グルコース+PBS	0.175
グルコース+カルノシン	8.455
ソルビトール+PBS	0.000
ソルビトール+カルノシン	0.209
カルノシン+PBS	0.041
グルコース+D, L-アラニン	0.266
ソルビトール+D, L-アラニン	0.008
グルコース+ベータ-アラニン	1.240
ソルビトール+ベータ-アラニン	0.010
グルコース+L-アルギニン	0.469
ソルビトール+L-アルギニン	0.010
グルコース+L-リジン	1.70
ソルビトール+L-リジン	0.009
グルコース+イミダゾール	0.046
ソルビトール+イミダゾール	0.035

## 表3表

カルノシン、関係するペプチド及びアミノ酸とジヒドロキシアセトンの反応

カルノシン、関係したペプチド及びアミノ酸に対するDHAの反応率を比較す  
る(表3表)時に、カルノシンはリジンよりも速やかに反応し、ジペプチドがグ  
リケーションのためのアミノ基の他のソースに対して競合できることを示唆して  
いる。しかしながら、この定数においてリジンはその反応に寄与する2つのアミ  
ノ基を有しているのに、タンパク質中ではイブシロンアミノ基のみが有効に使  
用される。イブシロンアミノ基の単独のグリケーション割合の比較は、アルファ  
アミノ基を基とする、N-アルファ-カルボベンゾキシル-L-リジン(L-リジン

)が用いられる。DHAがZ-リジンのカルノシンの等モル混合液に添加される  
時、そのジペプチドは遊離アミノ酸よりも速やかに、約10倍の反応をする(第  
3表)。相対的な反応性は、グルコースが多量化の糖として観察されるときに保  
持され、その実験は10日間を完全に要する(表示せず)。蛋白質内に合併され  
たリジン残基によく類似した分子であるAc-Lys-NHMeは、カルノシン  
と比較してDHAとより速い反応を示した。ペプチドAc-Lys-His-NH  
H<sub>2</sub>は蛋白質中の優先のグリケーションサイトに類似し、カルノシン残基のよう  
な同様の作用を示した。ペプチドのベータ-アラニル-グリシンはDHAと実質  
的に反応せず、従ってグリケーションのためのペプチド中の2つの位置でヒス  
チジンのための要求物が提供される(ShiltonとValton, 1991)。D-カルノ  
シン(ベータ-アラニル-D-ヒスチジン)が自然出現アイソマーと同じくらい  
速く反応する間に、より高い割合の。相同カルノシン(ガンマ-アミノ-ブチ  
リル-L-ヒスチジン)はゆっくりと反応した。これは、カルノシンに小さな側  
面上の変更(メチレン基の付加)がその反応性を減じていることを示す。それは  
また、各種の高によるリジンの実質が反応率に関して意味のある効果を持してい  
ることが明白となる。Ac-Lys-NHMe(遊離アミノとカルボキシル基  
)がより速やかに反応するのに対し、Z-リジンは遊離アミノ酸よりもゆっくり  
と反応した。

それはまた、遊離イミダゾールとサクシニルヒスチジン(アルファアミノ基  
が基盤された)が、ジペプチドのアミノ基の損失の割合の増大によって示される  
ようなDHAとカルノシンの反応性を増進させることが見出された。これは、ア  
マドリ移の触媒として又はAOE-生産物に向う反応の平衡をそれによって変  
化させる中間の形態との反応のいずれか一方のイミダゾールであることの示唆と  
一致している(ShiltonとValton, 1991)。

[以下空白]

## 表3表

化合物	反応した%
A ベータ-Ala-L-His-OH	2.6
ベータ-Ala-D-His-OH	2.6
Ac-Lys-His-NH <sub>2</sub>	2.5
Ac-Lys-NH <sub>2</sub> Me	2.1
H-Lys-OH	1.7
ガンマ-アミノ-ブチリル-His-OH	1.5
Z-Lys-OH	3
ベータ-Ala-Gly-OH	2

ペプチドのグリケーションとDHAによるアミノ酸の損失。

AとB・化合物は60℃で5時間のあいだPBS中でDHAと反応させ、遊離  
アミノ基の損失をHPLCによって定量化した。データはDHAと反応したアミ  
ノ基のパーセントとして表現した(インキュベーション混合物中の全ペプチド又は  
アミノ酸のSEM ±1%)。B単独・サクシニル-Hisとイミダゾールはベ  
ータ-Ala-L-His-OHと定量化後のアミノ基に等モル濃度で添加し  
た。

## 表4表

グリケート化アミノ酸とグリケート化カルノシンの実質原性の特性

リジンとアルギニンのようなグリケート化アミノ酸(glycated amino acids)  
はHaronとAnes(1983)“エイムス試験”によって最初に提示された分析システ

ムにおいて実質活性のあること (Ii. 5, 1991) が報告されている。他のプロリンとシステインのようなグリケート化アミノ酸は実質活性が示されていない。我々は L-カルノシンの実質活性を調査し、また L-カルノシン、L-リジン及び L-アラニンからグリケート化している (第4表)。4つの試料の全ては、特に 250 μl 投与で 何等かの阻害作用が認められた。我々のデータでは、グリケート化された L-リジンが実質活性であり、それによって免疫性があるであろうという (Ii. 5 (1991)) による前の結果と一致する。その活性は、ラット肝の S-9 代謝活性化システムによってわずかに増加する。グリケート化された L-アラニンは以前の報告では弱い実質活性であり、我々の実験においては実質活性でないことを示した。通常カルノシンとグリケート化されたカルノシンの両方は実質活性ではなかった。これは、インビボのメイラード反応において重要な有る役割をカルノシンが演じるであろうことが予測されるであろう。L-カルノシンと L-リジンのグリケート化の形態の差異の理由は知られていない。

(以下空白)

#### 第4表

T A 1000 によるプレート内の免疫活性			
化合物	投与 (μl)	S-9 なし	S-9 あり
L-カルノシン	250	158 ± 11	149 ± 13
	50	154 ± 14	179 ± 15
グリケート化された L-カルノシン	250	142 ± 17	158 ± 19
	50	159 ± 7	167 ± 10
グリケート化された L-リジン	250	277 ± 21	244 ± 13
	50	357 ± 17	353 ± 19
L-アラニン	250	145 ± 6	146 ± 9
	50	160 ± 9	161 ± 10
結性コントロール			
+ アジド		>1000	N/A
+ 2 A F		N/A	250 ± 33
+ 2 A A F		N/A	500

#### グリケート化された化合物の実質活性ポテンシャル

サルモネラ タイフィウム (Salmonella typhimurium) T A 1000 は、his<sup>+</sup> から his<sup>-</sup> への突然変異の阻害剤である。データはプレート内の免疫

細胞の平均値と、ラット肝のミクロソーム的な (S-9) 変異物によって代謝性阻害の有るものと無いもののそれらの試験形態とコントロールのための標準偏差とを所収した。

#### 実験例 6

##### 非経口的なグリコシレーションによる阻害としてのアミノグアニジンとカルノシンの比較

ウシ血清アルブミン (BSA) とオボアルブミンのグリコシレーションに関するカルノシンとアミノグアニジンの両方の効果の比較は、DNA の一定量と、抗グリケターはいずれかについて濃度を表したものを 50 でインキュベートしてなされた。反応の出現時間と 7 時間経過後の一定部分を取り、反応物の異物はスパーロス 6 (Sperose 6) カラムによるゲルろ過によって分析した。蛋白質の糖基化とフラグメント状態は、コントロールとして使用した未処理の蛋白質と比較した保持時間中の変化として目に見えて明確となる。幾つかの化合物は、最も小さな化合物のために理論上の保持時間の後に現れた。それらは高いイオン濃度と溶媒 (フィーン 20) の存在で一種のカラム樹脂で固定される傾向がある。それらは小さな化合物の必要性ではなく、むしろ高い反応性と反応性である。我々はこれらのデータを要約する。2つの化合物はこのシステムにおいて別々に反応すると思われる。カルノシンは高分子量の化合物の形成が阻害され、アミノグアニジンに比べ低い濃度で質的に多くの効果がある。反応生成物が検出されない全てのアミノグアニジン試料は高濃度で質的に形成される (低分子量の形態 "LMW" として記載され、何故ならばその保持時間は他の全ての化合物での既知より長い)。アルブミンモノマーのピーク面積が減少することから、これらはオボアルブミン、アミノグアニジンと DNA の間の反応生成物であろう。3つの化合物の全ては、保持時間又はピーク面積が 7 時間のあいだ両方の条件のもとで別々にインキュベートされる時に変化しないことが示された。LMW はまた、オボアルブミンがインキュベーション混合物中のウシ血清アルブミンによって取替えられる時に既知される (表記せず)。その LMW はカルノシン試料中に少しも存在していない。

#### 第5表

オボアルブミン			
クロマトグラムの面積パーセント			
	HMW	モノマー	LMW
0 時間			
カルノシン試料			
[A] から [D]	0	100	0
[コントロール]	0	100	0
アミノグアニジン試料			
[A] から [D]	0	100	0
[コントロール]	0	100	0
7 時間後			
カルノシン試料			
[A]	9	91	0
[B]	6	94	0
[C]	3	97	0
[D]	25	75	0
[コントロール]	68	32	0
アミノグアニジン試料			
[A]	0	31	69
[B]	8	20	72
[C]	0	41	49
[D]	38	40	22
[コントロール]	68	32	0



凡例・オボアルブミンは、カルノシン又はアミノグアニジンのいずれか一方が各様の重量で存在する中で7時間のあいだU H Aと一緒にインキュベートした。反応生成物はゲルろ過カラム（スパローズ6）で分離し、ピークは保持時間によって分離した・H M W 高分子量（15-30分）；アルブミンモノマー（35分）；及び遊離して放出する化合物L M W、低分子量（>40分）。カルノシンとアミノグアニジン濃度は【コントロール】0 mM、【A】600 mM、【B】300 mM、【C】100 mM、【D】50 mM。

抗-グリケター有効性のために良い尺度は、反応の7時間後に残存する未反応のアルブミンの量である。この点でカルノシンはアミノグアニジンと比べ全ての濃度でより有効であった。

#### 実施例7

##### アテローム硬化におけるカルノシンの効果

冠状動脈心臓疾患は糖尿病及び同時に非糖尿病の最も多い死因の1つである。グリケーションはアテローム性プラーク（atherosclerotic plaques）に加え、糖尿病性腎臓や目の疾患を含む多くの糖尿病合併症の基盤を包含している。コレステロール結晶ワッジは8週間の期間を超えてアテローム性プラークに關するカルノシンの効果を試験に使用した。我々の研究では、カルノシンによりグリケーションの抑制がプラーク形成を妨げ減じることができるとを示している。これらの結果は第2図に示される。

そのデータのための2つのテールPはマン-ホイットニー（Mann-Whitney）の2サンプル試験を用いて算出した：両部大動脈=0.0529；腹部大動脈=0.3368；大動脈弓=0.8623。全てのデータはアミノグアニジン（n=11）給餌に対して糖尿病コントロール（n=12）。その他の動物は統計的に有意な結果を与えるこの研究において使用した。しかしながら、これらは非糖尿病グリコシル化の抑制の両方がプラーク形成を減じ得ないことを明確に示す。

その動物の量は8週間の処理期間を超えて減少し、しかしながらコントロールとカルノシン処理群の間で差はなかった。

させるであろう。我々はストレプトゾトシンを導入した糖尿病ラットモデルにおいてこれを試験している。カルノシン食餌動物について8週後は、糖尿病コントロール群（Mann-Whitney 2サンプル試験 2テールP値=0.2092；カルノシン給餌に於ける糖尿病コントロール）に比べて高度な明瞭性（混濁なし）を示した（第3図参照）。これは5.6日で測定されて以来、実験の半路まで、その傾向がカルノシン給餌によって白内障の形成における減少として示される。

白内障は動物モデルにおける糖質の減少のみでなく誘発させることができる。バビツハエフ（Babishayev, 1989）は過酸化した脂質が動物モデルにおいて進展する糖尿病の開始的原因の1つとし得ることを示している。リポソームの脂質物の注入は後方膜下白内障の進展を誘発する過酸化した脂質を含有するリン脂質から調製した。同様な白内障モデルによる彼の発見は過酸化した脂質に基きカルノシンと類似の抗酸化剤によって抑制し得る。メイラード反応生成物の形成は、しかしながら、経路に従わず、抗酸化剤によって影響を及ぼすことができない。

【以下空白】

コントロールに対するカルノシン処理において観察された各種器官の重量にはなかった。

	体重 kg	
	0 週	8 週
コントロール	3.27 ± 0.09	2.75 ± 0.17
カルノシン	3.33 ± 0.09	2.68 ± 0.12

	8 週処理後の器官の重量 (g)		
	肝臓	腎臓	心臓
コントロール	135.94 ± 5.06	16.20 ± 0.67	1.92 ± 0.53
カルノシン	124.40 ± 6.36	17.33 ± 0.69	6.12 ± 0.27

#### 実施例8

##### 糖尿病ラットにおける白内障の形成に關するカルノシンの効果

白内障は十分な視力が必要な視覚レンズの混濁化である。糖尿病は、白内障の原因の1つの形態が糖尿病であるということが多くの年々と多くの臨床試験で支持されるという観点により糖尿病と関連付けられている。動物中の糖尿病はストレプトゾトシン（streptozotocin）によって誘発させることができ、レンズの混濁は注射20日後により遅延的に発生するが、混濁は注射時の年齢によって約100日後に出現した。

レンズの蛋白質を含んだ蛋白質への糖質の白内障内転は、確認され、定量されている。最も多数の組織では糖尿病において一様な後期のメイラード生成物の少しの蓄積があるが、レンズ中の蛋白質は早期のグリケーション生成物の蓄積は少なく、黄色のメイラード生成物に変化するそれらの時間を有する。化学的異性体と酵素の両方とも変性糖質の各種を生じる糖質の最初の攻撃は、糖蛋白質とレンズの結晶とそれら各々の経路が損傷を生じ得る。糖質の反応性アルデヒド基を測定可能なものとカルノシンに類似する化合物とは白内障の開始を減少

#### 実施例9

##### 糖尿病ラットにおける蛋白質、グリケート化したヘモグロビンと血中グルコースレベルに關するカルノシンの効果

8週で有意な変化のないことが次のパラメーターについて観察された。

アルブミン尿		
通常	糖尿病	糖尿病+カルノシン
2.4x/±1.3	2.51x/±1.07	2.51x/±1.48
グリケート化したヘモグロビン (HbA1c) パーセント		
通常	糖尿病	糖尿病+カルノシン
1.5±0.1	4.33±0.23	4.49±0.14
血中グルコース (mM 値+SEM)		
通常	糖尿病	糖尿病+カルノシン
10.0±1.5	29.84±4.88	22.63±3.00

蛋白質と糖尿病における変化は糖尿病条件の約30週後に唯一観察することができる。そのアミノグアニジン化合物、非酵素的グリコシレーションの防止のための有効な使用は、第4図30週後の一様な糖尿病モデルにおいてグリケート化したヘモグロビンの量が減少することはない。この研究は現在継続している。

明白に提示されたような発明の種又は範囲から逸脱することなく、特有な実施態様において示したような本発明により各種の変更及び/又は変形が形成されるであろうことは当業者においては明らかとなるであろう。本発明の真意範囲は、それ故、開示としての全ての開示において考慮されるものであり、それに限定されるものではない。

【以下空白】

文献

Gelentich, Y. & Amirehbi, S. (1900) Ber. Dtsch. Chem. Ges. 33, 1902-1903  
 Mallard, L. C. (1912) C. R. Acad. Sci. 154, 66-68  
 Shilton, B. B., & Valtou, D. J. (1991) J. Biol. Chem. 266, 5587-5592  
 Hannes, H. P., Martin, S., Federlin, K., Brownlee (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 11555-11558  
 Kim, S. B., Kim, I. S., Yoon, D. H., & Park, Y. B. (1991) Mol. Res. 254, 65-69  
 Maron, D. M., & Auer, B. P. (1983) Mol. Res. 113, 173-215  
 Babishayev, M. A. (1989) Biochimica et Biophysica Acta 1004, 363-371

[以下空白]

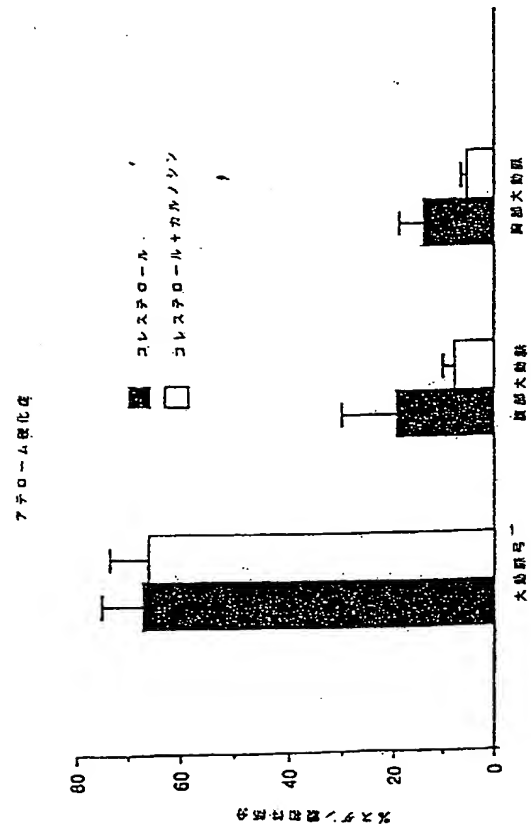


図2



図3

カルニチンと糖の反応

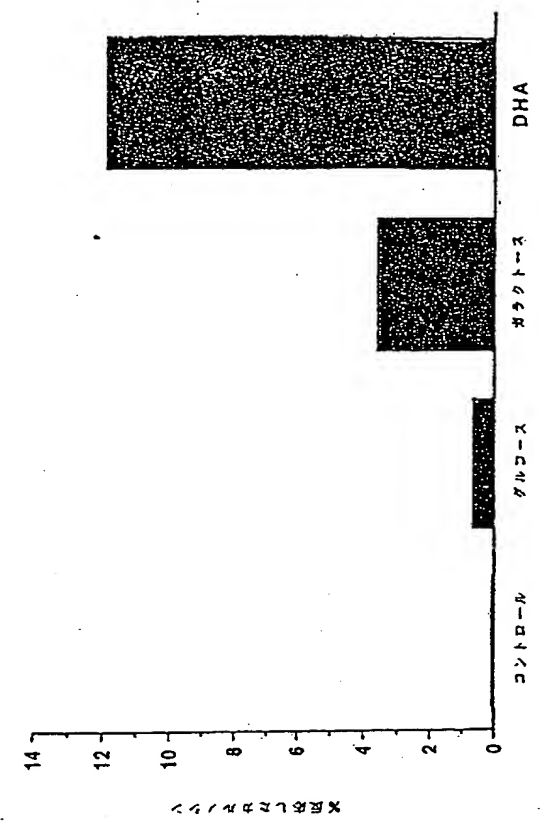


図4

## 国際調査報告

International application No.  
PCT/AU92/00489

## 国際調査報告

International application No.  
PCT/AU92/00489

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. <sup>8</sup> A61K 37/02	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELD OF SEARCH	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC <sup>8</sup> A61K 37/02	
Documentation searched other than minimum documentation in the extent that such documents are included in the fields searched AU: IPC as above	
Documents also have been searched during the international search (name of data base, and where practicable, search terms used) DERWENT; CHEM ABSTRACTS AND WHAT DATABASES USING THE KEYWORDS: CARBONIC, NOMO CARBONIC, ANSERINE, NOMO ANSERINE, OPRIDINE, CARBONIC AND DIABETES	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X ✓	EP A,313,594 (ZEDRA PHARMACEUTICAL CO. LTD. AND HAMARI CHEMICALS, LTD.), 3 May 1989 (02.05.89) page 5 lines 11-16, page 7 lines 2-4
X ✓	EP A,303,803 (HAMARI YAKUHIN KOTOY KABUSHIKI KAISHA) 13 February 1989 (15.02.89) page 2 lines 43-49, and the claims
X ✓	US A,471,771 (KINVESTRO NAGAI AND TAKIO SUDAI), 3 January 1988 (03.01.88) abstract 1 line 39-44, abstracts 9-10 lines 2-4, and the claims
X	Further documents are listed in the annexes of this report
X	See patent family annex.
Special categories of cited documents:	
"A"	Documents disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"B"	Documents which have been published as a result of an international search report
"C"	Documents which have been published as a result of an international search report
"D"	Documents which have been published as a result of an international search report
"E"	Documents which have been published as a result of an international search report
"F"	Documents which have been published as a result of an international search report
"G"	Documents which have been published as a result of an international search report
"H"	Documents which have been published as a result of an international search report
"I"	Documents which have been published as a result of an international search report
"J"	Documents which have been published as a result of an international search report
"K"	Documents which have been published as a result of an international search report
"L"	Documents which have been published as a result of an international search report
"M"	Documents which have been published as a result of an international search report
"N"	Documents which have been published as a result of an international search report
"O"	Documents which have been published as a result of an international search report
"P"	Documents which have been published as a result of an international search report
"Q"	Documents which have been published as a result of an international search report
"R"	Documents which have been published as a result of an international search report
"S"	Documents which have been published as a result of an international search report
"T"	Documents which have been published as a result of an international search report
"U"	Documents which have been published as a result of an international search report
"V"	Documents which have been published as a result of an international search report
"W"	Documents which have been published as a result of an international search report
"X"	Documents which have been published as a result of an international search report
"Y"	Documents which have been published as a result of an international search report
"Z"	Documents which have been published as a result of an international search report
Date of the international search report 15 December 1992 (15.12.92)	
Name and mailing address of the ISA/IIA AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200 WOODEN HILL ACT 2606 AUSTRALIA Postable No. (60) 2532929	
Authorized officer TAMARA NEDVOK Telephone No. (60) 2532989	

Form PCT/ISA/210 (Continuation of Form 2001-12-1972) COPLIN

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Referent to Class No.
X ✓	US A,450,872 (KINVESTRO NAGAI AND KINUKO NAGAI), 2 April 1983 (02.04.83) columns 5 lines 20-44, abstract 6, columns 7-11	12-15, 18-21
X ✓	WO A,900,102 (PEPTIDE TECHNOLOGY LIMITED), 14 June 1990 (14.06.90) page 3 lines 11-21	12-15, 18-21

Form PCT/ISA/210 (Continuation of Form 2001-12-1972) COPLIN

## 国際調査報告

International application No.  
PCT/AU92/00489

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent document cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report	Patent Family Member			
WO 9006102	AU 43320/89	EP 436611		
EP 313654	JP 63014728	US 4927817	WO 8800048	
US 4717716	CH 646183	DE 3540632	DK 3005153	
	FR 2577128	GB 2170707	JP 61184323	
	NL 8600112	SE 8305121		
EP 302799	IT 1912671	US 4781846		
US 450872				
END OF ANNEX				

Form PCT/ISA/210 (Continuation of Form 2001-12-1972) COPLIN

フロントページの続き

(72)発明者 ヒブキッス, アラン ロジャー  
イギリス国 SE12 0UF ロンドン  
リー ゲイブルス クローズ 83

(72)発明者 バナジオトパウロス, シアンナ  
オーストラリア国 3108 ヴィクトリア  
ドンキャスター ライアル コート 2